06-12

KOD -Plus-
Mutagenesis Kit

(Code No. SMK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

A3634K

ー 目 次 ー

[1] はじめに 1
[2] 本製品を用いたInverse PCR法による変異導入フロー 2
[3] 本製品に含まれているもの 3
[4] 本製品をお使い頂く上での注意事項 4
　(1) 鋳型として用いるPlasmidについて 4
　(2) PCR Primerの設計･品質について 4
　(3) PCR条件について 5
　(4) PCRエラーによる2nd-site mutationについて 5
　(5) コントロールPlasmidについて 6
[5] プロトコール 8
　(1) Inverse PCR 8
　(2) *Dpn* Iによる鋳型Plasmidの消化 9
　(3) PCR産物のSelf-ligation 9
　(4) 形質転換 10
　(5) 変異体の確認 10
[6] トラブルシューティング 11
[7] 参考資料 12
　(1) ご用意いただく培地、試薬の組成 12
　(2) 関連商品 13

ご注意

本製品は研究用試薬です。診断･臨床用試薬として決して使用しないでください。

また、本試薬の使用にあたっては実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as the patented 5' Nuclease Process claims in US Patents Nos. 5,210,015 and 5,487,972), no right to perform any patented method, and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[1] はじめに

本製品は、高正確性PCR**酵素**KOD -Plus-**の高い正確性を活かした、**Inverse PCR (iPCR)**法に基づく部位特異的変異導入キットです。**

Inverse PCR**法では、環状**DNA (**プラスミド**) **を鋳型として、逆方向に設定した**2**種類のプライマーを用いて**PCR**を行い、プラスミド全周の増幅を行います。その際、導入したい変異や挿入配列を付加したプライマーを用いることにより、**PCR**産物に塩基置換や挿入配列を導入します。また、一部を欠失させたい場合には、その領域の外側にプライマーを設定し**PCR**を行います。その後、直鎖状プラスミドである**PCR**産物を**Self-ligation**することにより環状化し、大腸菌の形質転換に供します。**

本製品には以下のような特長があります。

1. **幅広い変異導入に対応**

Inverse PCR**法の採用により、数**bp**の置換、挿入、欠失のみでなく、数**10bp**の挿入** (Tag**の導入**) **や数**100bp**の欠失等にも対応可能です。**

また、特定部位のアミノ酸を20**種類のアミノ酸に置換するなどの** Mutant Clone Collection **の作製** (Saturation Mutagenesis) **も可能です。**

2. **確実な変異導入**

最大95%**の変異導入効率が得られます。また、**KOD -Plus-**の採用、およびPCR**サイクル数を最小限に設定するなどの条件の最適化により、**PCR**エラーによる**2nd-site mutation (**目的とする変異以外の変異**) **が入る可能性を最小限にしています。プラスミドの大きさは、**10kbp**以上のプラスミドで変異導入を確認済みです。**

3. **簡単プロトコール***

本製品では、PCR**産物の**Self-ligation**を、**Kinase**と**Ligase**を同時に反応させて行います。従って、**PCR Primer**のリン酸化は不要です。また、形質転換まで**3**ステップの簡単なプロトコールとなっています (図**1**)。**

***特許出願中**

[2] 本製品を用いたInverse PCR法による変異導入フロー

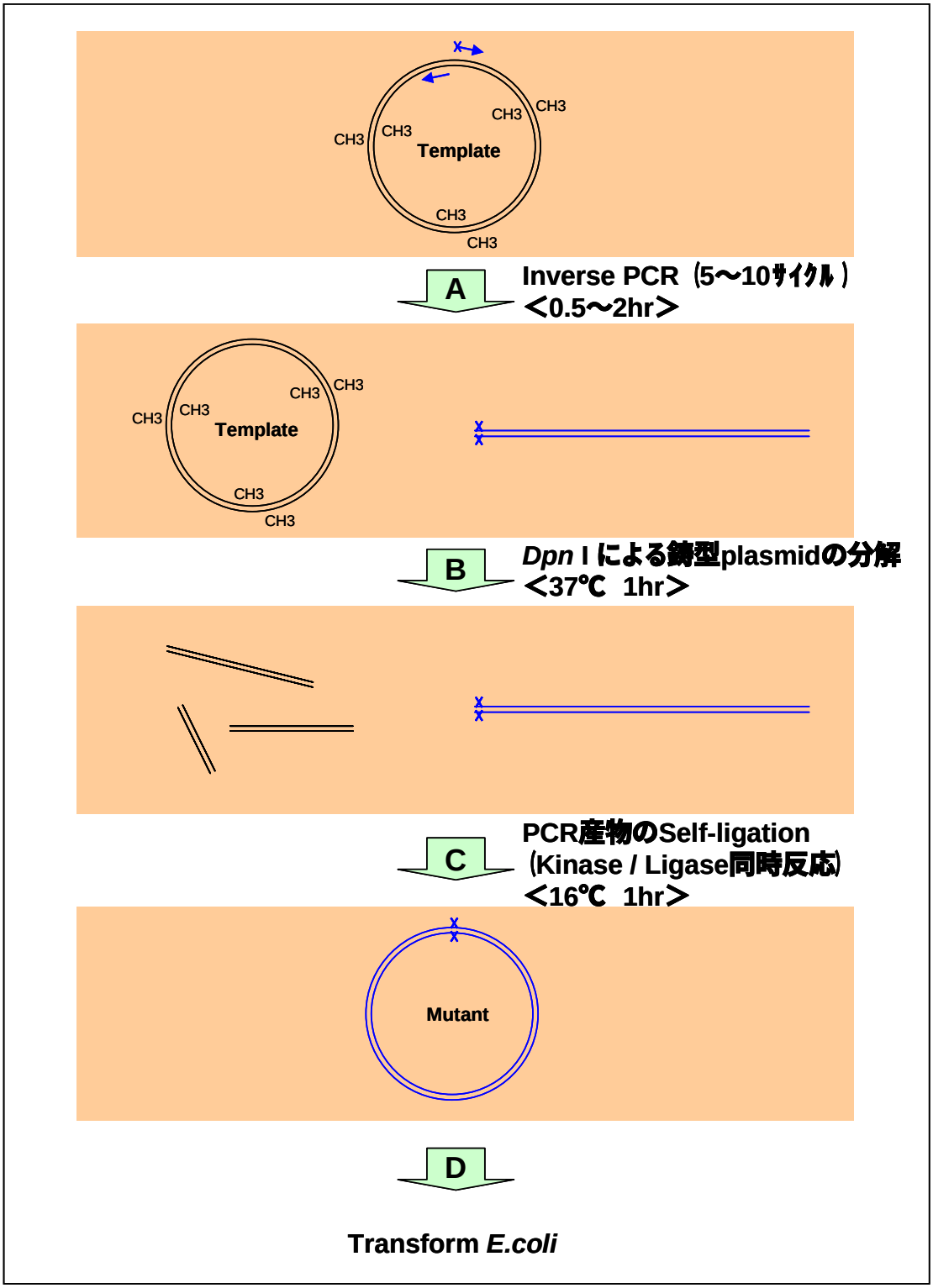

図1．本製品を用いた Inverse PCR 法による変異導入フロー

(A)メチル化されている Plasmid ＤＮＡを鋳型に、変異を入れ込んだプライマーを用いて Inverse PCR を行います。(B)メチル化されている DNA を特異的に分解する制限酵素 *Dpn* I を作用させて鋳型 Plasmid ＤＮＡを分解します。(C)T4 Polynucleotide Kinase と Ligase を同時に作用させて PCR 産物を自己環状化させます。(D)最後に環状化された PCR 産物を形質転換に供します。

[3] 本製品に含まれているもの (-20℃保存)

ﾊﾟｰﾂ No.		(20 回用[*1])
1	KOD -Plus- (1U/μl)	25 μl
2	10x Buffer for iPCR	125 μl
3	2mM dNTPs	125 μl
4	*Dpn* I(10U/μl)	50 μl
5	T4 Polynucleotide Kinase(5U/μl)	50 μl
6	Ligation high	250 μl
7	Control Plasmid pAK119M (50ng/μl)	10 μl
8	Control Primer #1 (10 pmol/μl)	10 μl
9	Control Primer #2 (10 pmol/μl)	10 μl

[*1)] **本キットには、**20 **回分のサンプル反応および** 5 **回分のコントロール反応を行うのに十分な試薬が含まれています。**

＜その他に必要な試薬＞

- LB **寒天培地**
- 50mg/ml **アンピシリンまたは** 20mg/ml **カナマイシン**
- 4% X-gal **および** 100mM IPTG (**コントロール** Plasmid **を用いて** Blue/White **セレクションを行う場合**)
- **コンピテントセル** (**弊社** Competent high DH5α (Code No.:DNA-903) **あるいは** JM109 (Code No.:DNA-900) **のご使用をお奨めします。**)

[4] 本製品をお使い頂く上での注意事項

(1) 鋳型として用いるPlasmidについて

本製品では、PCR産物を大腸菌への形質転換に供する前に、鋳型として用いたPlasmidを*Dpn* Iにて切断し、変異体の取得率を高める操作を行います。この*Dpn* Iは、G^{m6}ATCの認識配列を持ち、メチル化あるいはヘミメチル化されているDNAに特異的に作用します。従って、本製品で鋳型に用いるPlasmidは、メチル化を受けているDNAである必要があります。JM109やDH5αのような一般的な大腸菌で調製したPlasmidは、dam methylaseによってメチル化を受けており、本製品に問題なく使用することができます。一方、damマイナス株であるJM110、SCS110などや大腸菌以外のホストで調製したPlasmidは、メチル化を受けておらず、そのままでは本製品に使用できません。これらのPlasmidを用いる場合には、本製品に用いる前に、*in vitro*にてdam methylase処理を行うか、あるいは、JM109等のdamプラス株にてPlasmidを調製し直してください。

(2) PCR Primerの設計・品質について

①設計について

変異導入プライマーの設計にあたっては、一般的なPCRプライマーの設計にあたって注意すべき事項に留意しつつ、導入したい変異をプライマーに入れ込みます(図2)。その際、変異導入部位(プライマーと鋳型でミスマッチとなる部分)は、プライマーの5'端、あるいは5'端に近い部位となるようにし、3'端には鋳型と相補性のある領域が少なくとも20bp以上(望ましくは25bp程度)になるようにします[注]。また、変異導入に伴って制限酵素サイトが出現あるいは消失するように設計すると、変異体をスクリーニングする際や確認する場合に便利です。

なお、本製品では、PCR産物のセルフライゲーションと同時にリン酸化を行いますので、プライマーのリン酸化は不要です。

注) 本キットで使用するPCR酵素KOD -Plus-は、3'→5' Exonuclease活性(Proofreading活性)を有しています。プライマーの3'端に近い位置に変異導入部位を設定した場合、この校正活性により、プライマーに入れ込んだ変異が修復され、目的の変異体が得られない場合があります。

②品質について

Inverse PCR法に基づく変異導入では、PCRプライマーの品質、特に全長性が成功率に大きく影響します。例えば、5'端が欠落している不完全なプライマーが混入している場合には、最終的にセルフライゲーションジャンクションでその塩基が欠失してしまうことになります。従って、プライマーは、HPLC精製グレードのものを使用されることをお奨めします。特にプライマーの5'端近傍に同一塩基の連続がある場合には、HPLC精製グレードのプライマーのご使用を強くお奨めします。また、40merを超えるプライマーの場合は、PAGE精製グレードにされることをお奨めします。

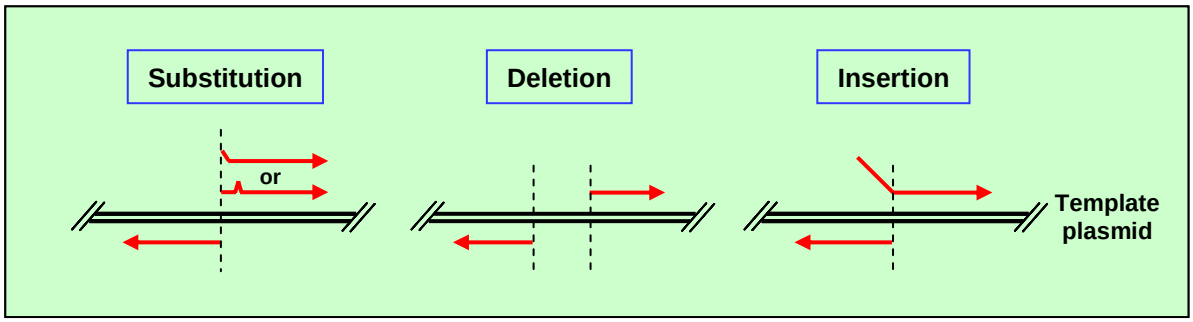

図2． 置換、欠失、挿入の各変異導入のプライマー設計例

●Substitution（塩基置換）：プライマーの5’端、あるいは5’端に近い位置に変異を入れ込んだプライマーを設計します。その際、そのプライマーの3’端には鋳型と相補性のある領域が少なくとも20bp以上（望ましくは25bp程度）になるようにします。
●Deletion(欠失)：欠失させたい領域の外側にプライマーを設定します。あるいは、数塩基の欠失であれば、塩基置換と同様に欠失を入れ込んだプライマーを設計します。
●Insertion(挿入)：プライマーの 5’端に、挿入したい配列を付加したものを設計します。その際、そのプライマーの3’端には鋳型と相補性のある領域が少なくとも20bp以上（望ましくは25bp程度）になるようにします

(3) PCR条件について

Inverse PCR法に基づく変異導入では、PCRの際に非特異的増幅が生じると、目的の変異体が得られる成功率が大幅に低下します。本製品では、iPCR専用bufferを添付するとともに、2ステップのPCRサイクルを採用することにより、可能な限り非特異的増幅が生じないようにしています。しかしながら、鋳型Plasmidの品質、プライマー配列によっては、非特異的増幅が生じる可能性もあります。従って、本実験を実施する前に、予備実験を実施し、非特異的増幅の有無を確認されることをお奨めします。予備実験では、PCRを10～20サイクルにて実施し、アガロースゲル電気泳動にてエキストラバンドが発生しないPCR条件の検討を行います。条件を見出せたら、PCR反応組成はそのままで、サイクル数を下げて本実験を行います。

(4) PCRエラーによる2nd-site mutation（目的とする変異以外の変異）について

本製品では、PCRに高正確性酵素KOD -Plus-を使用するとともに、サイクル数を最小限に設定することにより、可能な限り2nd-site mutationが入りにくい条件となっています。しかしながら、極めて低い頻度ですが、2nd-site mutationが入る可能性があります。また、プライマーの合成段階でも、誤った塩基が取り込まれる可能性があります。従って、次の実験に使用される前に、問題となる領域については必ずシーケンシングを行い、配列の確認を行ってください。

(5) コントロールPlasmidについて

本製品には、コントロールPlasmid として、予め変異を入れたlacZ α遺伝子を有するPlasmid(pAK119M)を添付しています。この変異により、本lacZ αの6番目のコドンはTAA (stop) となっており、本Plasmidをそのままの状態にて大腸菌に形質転換すると、X-gal入りのプレート上で白コロニーとなります。一方、本製品付属のコントロールプライマーを用いて、TAA (stop) →CCA (Pro) に戻す変異を入れることにより、青コロニーを呈するようになります (図3)。これにより反応が正常に進んだかを簡便に確認することができます。本プロトコールに従った場合、通常80%以上の割合で青コロニーが得られます。

なお、本Plasmidは、アンピシリンとカナマイシンの2つの薬剤耐性遺伝子を持っています。

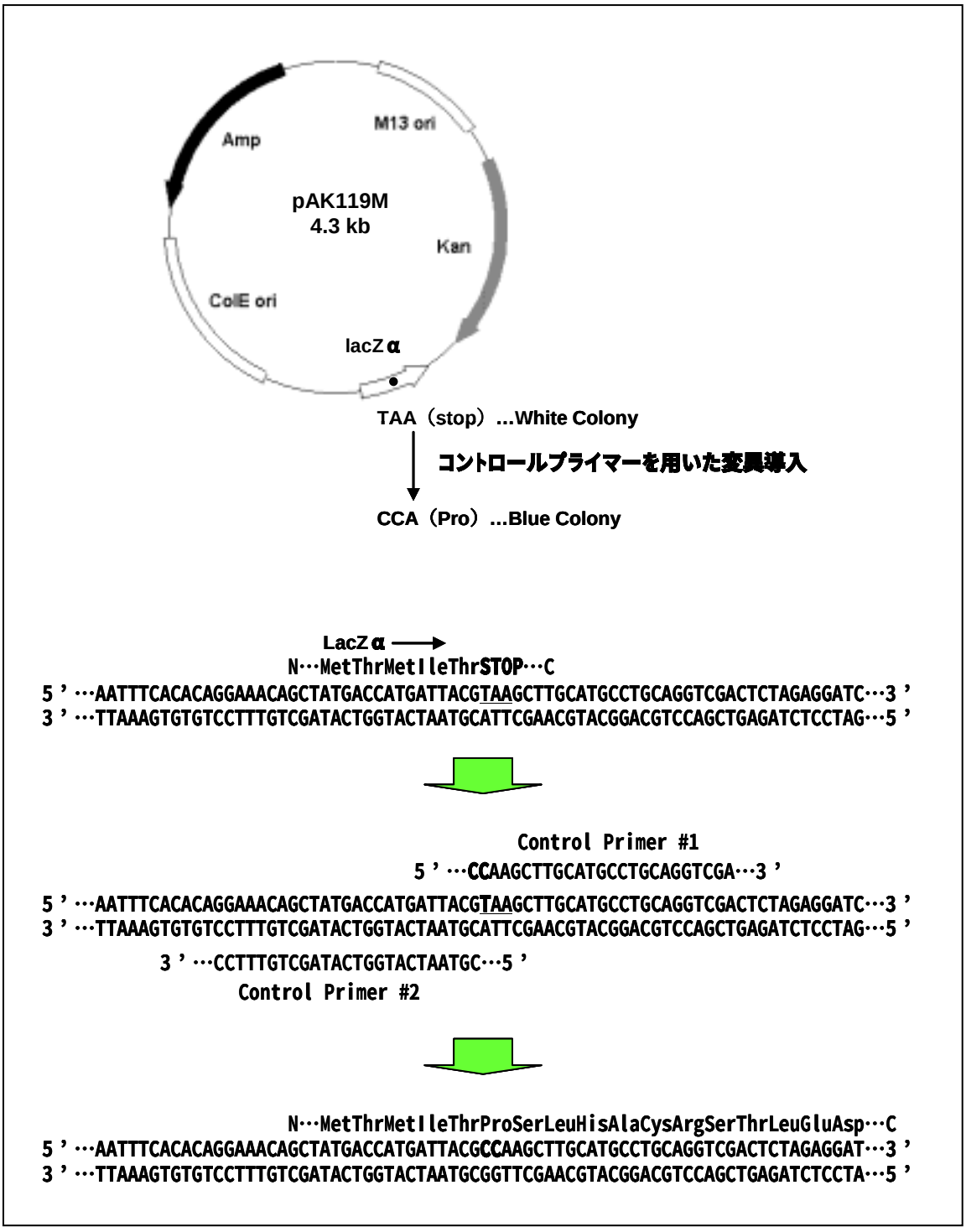

図3. コントロール Plasmid およびコントロール反応の概略

Control Plasmid pAK119M の LacZα（β-galactosidase の alpha fragment）には予め CC→T の変異が導入されています。これにより LacZαの 6 番目のコドンは TAA（stop）となっており、本 Plasmid をそのままの状態にて大腸菌に形質転換すると、X-gal 入りのプレート上で白コロニーとなります。一方、本製品付属のコントロールプライマーを用いて、T→CC に戻す変異を入れることにより、6 番目のコドンは、TAA（stop）→CCA（プロリン）となり、全長の LacZαが生成されるようになります。その結果、X-gal 入りのプレート上で青コロニーを呈するようになり、変異が導入されたことを簡便に確認することができます。

[5] プロトコール

(1) Inverse PCR

① **各**PCR**プライマーの濃度を**10 pmol/μl**に、鋳型**Plasmid DNA**の濃度を**50ng/μl**に調整します。**

② PCR**用チューブに以下のように反応液を調製します。**

滅菌蒸留水	35μl
10×Buffer for iPCR	5μl
2 mM dNTPs	5μl
プライマー1 (10 pmol/μl)	1.5μl
プライマー2 (10 pmol/μl)	1.5μl
Plasmid DNA (50ng/μl)	1μl
KOD -Plus-	1μl
Total Volume	50μl

③ **以下の反応サイクルにて**PCR**を実施します。**

94℃ 2 min
98℃ 10 sec
68℃ X min*1 ← Y (4～10) **サイクル***2
4℃ Hold

注1) **増幅するｻｲｽﾞ** (kb) **を基に、**1min./kb**を目安に設定します。例えば、**5kb**の**Plasmid**の全周を増幅したい場合には、**5min**. に設定します。**

注2)**増幅するｻｲｽﾞ** (kb) **を基に、**1**サイクル**/kb**を目安に設定します。但し、最終的に得られるコロニー数は、用いるコンピテントセルの形質転換効率等によっても変動しますので、実験に余裕がある場合には、反応液を**2**分割し、二通りのサイクル数にて実施されることをお奨めします (例えば、**5**サイクル**と**10**サイクル**)。なお、予備実験 (PCR**反応条件の確認**) として、**PCR**産物を電気泳動にて確認する場合には、**10～20**サイクル**にて実施します。**

注3) **キット付属のコントロールプラスミドとコントロールプライマーを用いてコントロール実験を行う場合には、以下の要領にて実施します。**

滅菌蒸留水	35μl
10×Buffer for iPCR	5μl
2 mM dNTPs	5μl
Control Primer #1 (10 pmol/μl)	1.5μl
Control Primer #2 (10 pmol/μl)	1.5μl
Control Plasmid pAK119M (50ng/μl)	1μl
KOD -Plus-	1μl
Total Volume	50μl

94℃ 2min
98℃ 10sec ← 5 **サイクル**
68℃ 5min
4℃ Hold

(2) *Dpn* Iによる鋳型Plasmidの消化

① PCRの終了した反応液(全量50μl)に、*Dpn* I 2μl を加え、タッピングにてよく攪拌します。

注) PCR反応液を2分割してPCRを実施した場合には各々に*Dpn* I 1μl を加えます。

② 軽くスピンダウンした後、37℃で1時間、インキュベートします。

注) PCRに続いてサーマルサイクラーを用いて行うと便利です。

(オプション) *Dpn* I処理後の反応液5μlをアガロースゲル電気泳動に供し、PCR増幅産物の確認を行います。但し、サイクル数が少ない(5サイクル程度以下の)場合には、バンドが確認できない場合があります。その場合であっても、ほとんどの場合、コロニーは得られますので反応を継続してください。

(3) PCR産物のSelf-ligation

① T4 Polynucleotide Kinaseおよび Ligation highのチューブを取り出し、氷上にてキープします。Ligation highについては、溶解後、タッピングにて軽く攪拌し、スピンダウンを行います。

② 新しいPCR用チューブに以下の順番で反応液を調製します。

Dpn I 処理済み PCR 産物	2μl
滅菌蒸留水	7μl
Ligation high	5μl
T4 Polynucleotide Kinase	1μl
Total Volume	15μl

③ タッピングにて軽く攪拌した後、スピンダウンします。

④ 16℃で1時間、インキュベートします。

注) 引き続きサーマルサイクラーを用いて行うと便利です。

⑤ 反応液の一部を大腸菌の形質転換に使用します。

(4) 形質転換

＊ここでは東洋紡コンピテントセル (Competent high DH5α (Code No.:DNA-903)、Competent high JM109 (Code No.:DNA-900)、など) を使用する場合の標準的な手順を示します。詳細については、製品添付の取扱説明書をご参照ください。

① Competent Cell (100μl) を氷上にて融解します。

注) 融解後、必要により小分注します。その場合、以下のステップでは、反応ボリュームに応じて加える反応液・培地の量を加減します。

② (3) でSelf-ligationを行った反応液10μlを加えて混合し、氷上にて30分間放置します。

注) コンピテントセルの形質転換効率を確認するため、pBR322を用いて同時に形質転換することをお奨めします。例えば、pBR322を1pg使用し、本プロトコールに従って培養液を100μlまいた場合、形質転換効率が$1x10^9$cfu/μg-pBR322のコンピテントセルであれば、およそ100個のコロニーが得られます。

③ 42℃、30秒間ヒートショックした後、氷中で2分間冷却します。

④ SOC培地900μlを加え、37℃で1時間振とう培養します。

⑤ 適当な抗生物質を含むLB寒天培地に適量をまきます。

注) 複数のプレートに10～200μlずつまくことをお奨めします。
注) 本キット付属のコントロール実験を行う場合には、LB/アンピシリン/IPTG/X-galプレートまたはLB/カナマイシン/IPTG/X-galプレートにまきます。

⑥ 37℃で1晩 (～16hr) 培養します。

注) コントロール実験では、形質転換効率が$1x10^9$cfu/μg-pBR322のコンピテントセルを用いて100μlまいた場合であれば、数100個程度のコロニーが得られます。また、反応に問題がなければ、全コロニー数に対する青コロニー数の割合 (変異導入率) は、80%以上となります。

(5) 変異体の確認

まず4～8個程度のコロニーを液体培養し、ミニプレップにてPlasmidを調製します[注]。次に、制限酵素処理およびアガロースゲル電気泳動にてPlasmidが目的のサイズであることを確認します。また、変異の導入に伴って制限酵素サイトが出現、消失する場合には、その確認を行います。その後、シーケンシングにて変異箇所および必要な領域の配列の確認を行うことにより、効率良く変異体を取得することができます。

また、施設のシーケンシング能力が高い場合には、直接シーケンシングにてスクリーニングすることも可能です。

注) 二通りのサイクル数にてPCRを実施し、何れの条件からもコロニーが得られた場合には、少ないサイクル数で実施した方のコロニーを用います。

[6] トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	コメント
コロニーが得られない、少ない。	Inverse PCR がうまくいっていない。	予備実験を行い、目的とする断片が特異的に増幅されるよう、PCR 条件、プライマーのデザインを再検討してください。あるいは、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドの切り出しを行ってください。
	目的とする断片の増幅量が少ない	Inverse PCR のサイクル数を増やしてください。
	コンピテントセルの形質転換効率が低い。	10^8 cfu/μg-pBR322 以上の形質転換効率を持ったコンピテントセルをご使用ください。
コロニーがプレート一面に出る。（予想よりコロニー数が多い。）	鋳型 Plasmid がメチル化されていない。	*In vitro* にて dam methylase 処理を行うか、あるいは、dam プラス株にて鋳型 Plasmid を調製し直してください。（詳細は[4](1)をご参照ください。）
	寒天培地プレートの抗生物質量が不足している	適切な抗生物質を含む寒天培地プレートを再調製してください（アンピシリンを含むプレートは4℃で約1ヶ月保存できます）。
目的の変異体が得られない。（短いサイズの Plasmid しか取得できない。）	Inverse PCR がうまくいっていない。（ミスプライミングにより短い PCR 断片が生じている）	予備実験を行い、目的とする断片が特異的に増幅されるよう、PCR 条件、プライマーのデザインを再検討してください。あるいは、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドの切り出しを行ってください。
目的の変異体が得られない。（変異の入っていない Plasmid しかとれない。）	Inverse PCR がうまくいっていない。	予備実験を行い、目的とする断片が特異的に増幅されるよう、PCR 条件、プライマーのデザインを再検討してください。あるいは、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドの切り出しを行ってください。
	鋳型 Plasmid がメチル化されていない。	*In vitro* にて dam methylase 処理を行うか、あるいは、dam プラス株にて鋳型 Plasmid を調製し直してください。（詳細は[4](1)をご参照ください。）
コントロール反応において、ほとんどの、あるいは全部のコロニーが白コロニーになる。	IPTG、 X-gal が低濃度で青/白コロニーの判定ができていない。	LB/アンピシリン（カナマイシン）/IPTG/X-gal プレートの性能をご確認ください。また、アンピシリン（カナマイシン）、IPTG、X-gal の使用濃度を確認してください。
	青白判定ができない大腸菌を使用している。	DH5α、JM109 などの青白判定が可能なコンピテントセルを使用ください。

[7] 参考資料

(1) ご用意いただく培地、試薬の組成

・LB培地 (1L)
10g bacto-tryptone、5g bacto-yeast extract、10g NaClを1Lの蒸留水で溶解し、NaOHでpH7.2に調製する。

・LB/アンピシリンプレート
1LのLB培地調製後、15gの寒天末を加えてオートクレーブする。約50℃になってから、アンピシリンを終濃度100μg/mlとなるよう加え、シャーレに適量流し込み、寒天を固める。

・LB/カナマイシンプレート
1LのLB培地調製後、15gの寒天末を加えてオートクレーブする。約50℃になってから、カナマイシンを終濃度20μg/mlとなるよう加え、シャーレに適量流し込み、寒天を固める。

・100mM IPTG (10mL)
0.24g IPTGを蒸留水に溶解し、終量10mlとする。フィルター滅菌後、-20℃にて保存する。

・4% X-gal (10mL)
0.4g X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) をN,N-dimethyl- formamide (DMF) に溶解し、終量10mlとする。-20℃にて遮光保存する。

・LB/アンピシリン (カナマイシン) /IPTG/X-galプレート
LB/アンピシリン (カナマイシン) プレートに100mM IPTG、 4% X-galを各20μl塗布して、乾燥させる。

(2) 関連商品

品 名	内 容	Code No.
KOD -Plus- <高正確性 PCR 酵素>	200U	KOD-201
Dpn I	1,000U	DPN-101
T4 Polynucleotide Kinase	1,500U x1 本 1,500U x5 本	PNK-111 PNK-112
Ligation high <簡便・高効率なライゲーション試薬>	50 回用	LGK-101
MagExtractor® -Plasmid- <磁性ビーズを利用した Plasmid DNA 精製キット>	500 回用	NPK-301
MagExtractor® -PCR & Gel Clean up- <磁性ビーズを利用した DNA fragment 精製キット>	200 回用	NPK-601
Mag*ical Trapper* <磁性ビーズ分離用スタンド>	1台	MGS-101
Competent high DH5α <高効率 *E. coli* DH5α コンピテントセル、SOC 培地付>	100μl x10 本	DNA-903
Competent high JM109 <高効率 *E. coli* JM109 コンピテントセル、SOC 培地付>	100μl x10 本	DNA-900

【製造･販売元】

TOYOBO **東洋紡績株式会社**

－納期･注文に関するお問い合わせ－

ライフサイエンス事業部 （大阪）
〒530-8230 **大阪市北区堂島浜二丁目** 2 **番** 8 **号**
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

ライフサイエンス事業部 （東京）
〒103-8530 **東京都中央区日本橋小網町** 17 **番** 9 **号**
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

－製品の内容･技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00〜12:00 , 13:00〜17:00 （**土、日、祝を除く**）
E-mail : techosk@bio.toyobo.co.jp
［URL］ http://www.toyobo.co.jp/bio